

マウス破骨細胞の分化・骨吸収機能に対する
抗 Siglec-15 抗体の効果

餅田 愛

大学院歯学独立研究科 硬組織疾患再建学講座
(主指導教員：宇田川信之教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士（歯学）学位申請論文

Effect of anti-Siglec-15 antibody on mouse osteoclast
differentiation and bone resorbing function

Ai Mochida

Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,

Matsumoto Dental University

View metadata, citation and similar papers at CORE.ac.uk

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2018.08.14.241111>; this version posted August 14, 2018. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2018.08.14.241111>; this version posted August 14, 2018. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

(Chief Academic Advisor: Professor Nobuyuki Udagawa)

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

要旨

骨組織においては、破骨細胞による骨の吸収と骨芽細胞による骨の形成が絶え間なく繰り返されている。この骨吸収と骨形成のカップリングにより、力学的なストレスに耐えられる弾力性を有する新しい骨組織が形成される。近年、骨カップリング制御機構を説明するための重要な実験結果が蓄積してきた。Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) は、T 細胞や B 細胞の受容体と会合する細胞膜アダプター分子の細胞内ドメインに共通してみられるモチーフとして発見された。ITAM 配列を有する DNAX-activating protein 12 (DAP12) と Fc receptor common γ subunit (FcR γ) は、破骨細胞において発現が高い。DAP12 と FcR γ のダブル欠損マウスは骨吸収不全を呈する大理石骨病を惹起する。最近、DAP12 と会合する免疫グロブリンスーパーファミリー分子として、シアル酸受容体タンパク質である Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 15 (Siglec-15) が同定された。Siglec-15 は破骨細胞の分化に伴って誘導され、Siglec-15 遺伝子欠損マウスは骨吸収が抑制され骨量が増加するが、破骨細胞数はほとんど減少しない。また、骨形成に対しては、骨形態計測の結果から、骨芽細胞数や骨形成速度などの骨形成パラメーターが野生型正常マウスと比べ、ほとんど差が無いと報告されている。この実験結果は、破骨細胞の存在が骨芽細胞の活性を支え、骨吸収と骨形成がカップリングしていることを示唆している。本研究においては、Siglec-15 の作用を中和する抗 Siglec-15 抗体の効果について、マウス由来の細胞培養系において検討した。

抗 Siglec-15 抗体は、マウス骨髄細胞培養系に RANKL と M-CSF を添加し 3 日間で破骨細胞が誘導される条件で、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 陽性の多核破骨細胞の分化を阻害した。この時、TRAP 陽性の単核破骨細胞は多数残存していた。骨髄細胞を長期 (約 2 週間) にわたり培養する系において、Siglec-15 抗体は、TRAP 陽性の多核破骨細胞の分化を阻害すると共に、M-CSF と RANKL の存在下で

アルカリホスファターゼ（ALP）陽性の骨芽細胞を多数誘導した。抗 Siglec-15 抗体の代わりに、RANKL のデコイ受容体であるオステオプロテゲリン（Osteoprotegerin :OPG）を添加しても、ALP 陽性の骨芽細胞の誘導は認められなかった。長期骨髓細胞培養系においても、抗 Siglec-15 抗体は多核破骨細胞形成を抑制するが、単核 TRAP 陽性破骨細胞は多数残存していた。骨芽細胞と骨髓細胞の共存培養系において、RANK 陽性および c-Fms 陽性の破骨細胞前駆細胞（qOP）が出現する。抗 Siglec-15 抗体は qOP の形成に対して抑制効果を示さなかった。

成熟破骨細胞の機能に対する抗 Siglec-15 抗体の効果を解析した。抗 Siglec-15 抗体の 2 時間処理は、破骨細胞の象牙切片上におけるアクチンリング形成を阻害した。象牙切片上の吸収窩形成も抗 Siglec-15 抗体の 2 日間処理により強く阻害された。

最近、骨細胞の特異形質であるスクレロスチンは、骨形成を阻害する作用を有し、骨形成を制御する因子として重要な役割を果たしていることが明らかとされた。また、破骨細胞の培養上清は、骨肉腫由来細胞である UMR106 細胞に発現するスクレロスチンの発現を阻害することが報告されている。そこで、破骨細胞に抗 Siglec-15 抗体を処理し、その培養上清の UMR106 細胞におけるスクレロスチン発現に対する効果を解析した。その結果、抗 Siglec-15 抗体の処理の有無に拘らず、UMR106 細胞におけるスクレロスチン発現は阻害された。前述の実験系における破骨細胞由来のスクレロスチン発現抑制因子は、Leukemia inhibitory factor（LIF：白血病阻害因子）であることが明らかとされている。そこで、LIF を含む破骨細胞の特異形質発現に対する抗 Siglec-15 抗体の効果について検討した。成熟破骨細胞に抗 Siglec-15 抗体を処理しても、カテプシン K および RANK の発現維持と同様に、LIF 発現も維持されていた。

以上の実験結果から、抗 Siglec-15 抗体は多核破骨細胞の分化と骨吸収機能を阻害すると共に骨芽細胞の分化を促進する可能性が考えられる。

緒言

骨組織は、骨吸収と骨形成のバランスにより調節されている。それらのバランス調節は、互いにあたかも連絡を取り合っているかのようにみえるため、この現象は、骨代謝共役（カップリング）と呼ばれる¹⁾。骨粗鬆症（オステオポローシス）はこの骨代謝共役が破綻し、骨吸収が骨形成を凌駕するために発症する。破骨細胞分化因子である RANKL（receptor activator of NF- κ B ligand）が 1997 年に発見されて 20 年余経過した現在、骨粗鬆症患者や癌の骨転移による高カルシウム血症患者に対する抗 RANKL 中和抗体（デノスマブ）が治療薬として臨床応用されたことは、RANKL シグナル解明の重要性を物語っている²⁻⁶⁾。

破骨細胞は高度に石灰化した骨組織を破壊・吸収する唯一の細胞である⁷⁾。その起源は、生体に広く分布するマクロファージ系の細胞である。破骨細胞とその前駆細胞は RANK（receptor activator of NF- κ B）を発現し、骨芽細胞との細胞間接触を介して破骨細胞分化因子である RANKL を認識し、骨吸収活性を備えた成熟した破骨細胞に分化する⁶⁾。RANKL または RANK の遺伝子を欠損させたマウスでは破骨細胞が全く認められず、重篤な大理石骨病を発症することから、RANKL-RANK シグナル系は破骨細胞の分化に必須であることが証明された²⁻⁵⁾。

RANKL のデコイ受容体である OPG（Osteoprotegerin）をマウスに過剰発現させると、骨吸収が抑制された重篤な大理石骨病を呈する⁸⁾。また、Fos や Src などの癌遺伝子を欠損させたマウスにおいても、破骨細胞の分化または骨吸収機能に障害をきたし、骨吸収不全により骨形成が亢進する大理石骨病を呈することが報告されている²⁻⁵⁾。一方、OPG 遺伝子欠損マウスでは、破骨細胞の形成が促進し骨吸収の亢進が認められ、重篤な骨粗鬆症を呈する^{9,10)}。興味深いことに、OPG 遺伝子欠損マウスは骨吸収のみならず、骨形成のマーカーである血清アルカリホスファターゼ(ALP)活性が正常値の 4 倍も高い値を示し、組織学的にも骨形成の著しい亢進が認められた¹¹⁾。そこ

で、骨吸収と骨形成が共に亢進している高回転型骨粗鬆症を呈する OPG 遺伝子欠損マウスに対して骨吸収阻害薬であるビスホスネートを投与する実験が行われた。その結果、骨吸収の阻害とカップルして、骨形成の亢進はビスホスネート投与によって完全に正常化された¹¹⁾。以上の実験結果より、骨組織においては、骨吸収と骨形成の共役現象がアクティブに行われていることが明らかとなった。

最近、骨細胞の特異形質であるスクレロスチンは、骨形成を阻害する作用を有し、骨形成を制御する因子として重要な役割を果たしていることが明らかとされた。また、OPG 遺伝子欠損マウスを用いた実験結果から、骨細胞が産生する OPG およびスクレロスチンが皮質骨や歯槽骨の維持に重要な役割を果たしていることを明らかとされてきた^{12,13)}。一方、破骨細胞の培養上清は、骨肉腫由来細胞である UMR106 細胞に発現するスクレロスチンの発現を阻害することが報告されている。そこで、破骨細胞に抗 Siglec-15 抗体を処理し、その培養上清の UMR106 細胞におけるスクレロスチン発現に対する効果を解析した。その結果、抗 Siglec-15 抗体の処理の有無に拘らず、UMR106 細胞におけるスクレロスチン発現は阻害された。この実験系における破骨細胞由来のスクレロスチン発現抑制因子は、Leukemia inhibitory factor (LIF：白血病阻害因子)であることが明らかとされている¹³⁾。そこで、LIF を含む破骨細胞の特異形質発現に対する抗 Siglec-15 抗体の効果について検討した。成熟破骨細胞に抗 Siglec-15 抗体を処理しても、カテプシン K および RANK の発現維持と同様に、LIF 発現も維持されていた。

RANKL 誘導遺伝子の解析から、NFAT ファミリーに属する分子である NFATc1 は破骨細胞において RANKL により強く発現誘導される転写因子であることが明らかになった^{14,15)}。NFAT ファミリーは活性化した T 細胞において重要な役割を果たす転写因子であると考えられてきたが、NFATc1 は、生体レベルにおいても破骨細胞分化に必須である共刺激シグナルであることが証明された^{16,17)}。カルシウムシグナルは破骨

細胞分化において必須であるが、RANK はカルシウムシグナルを直接活性化することはできない。一方、免疫系細胞においてカルシウムシグナルを惹起す Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) と呼ばれる配列をもつ分子に着目した研究から、DNAX-activating protein 12 (DAP12) と Fc receptor common γ subunit (FcR γ) の二重欠損マウスでは破骨細胞分化が障害され、重篤な大理石骨病を呈することが報告された^{18,19)}。この知見は、DAP12 や FcR γ と会合する免疫グロブリン様受容体群を介したシグナルが、破骨細胞分化に必須であることを示している。すなわち、M-CSF の受容体である c-Fms と RANKL の受容体である RANK に続き、破骨細胞分化における新たな必須受容体として免疫グロブリン様受容体の存在が明らかとされたわけである。

DAP12 と会合する免疫グロブリンスーパーファミリー分子として、シアル酸受容体タンパク質 Sialic acid binding immunoglobulin-like lectin 15 (Siglec-15) が同定された^{20,21)}。Siglec-15 は、破骨細胞の分化に伴って発現が誘導されることも明らかとなった²⁰⁾。Siglec-15 は、細胞内に存在する DAP12 アダプタータンパク質と会合し、ITIM を介してシグナルを伝達する。このシグナルは RANKL シグナルと合流し、共刺激シグナルとして破骨細胞の形成を誘導することが証明された。近年作製された Siglec-15 遺伝子欠損マウスは骨吸収が抑制され、骨量が増加するが、破骨細胞数はほとんど変化しない^{22,23)}。また、骨形成に対しては、骨形態計測の結果から、骨芽細胞数や骨形成速度などの骨形成パラメーターが野生型正常マウスと比べ、ほとんど差が無いと報告されている。これらの実験結果は、破骨細胞の存在が骨芽細胞の活性を支え、骨吸収と骨形成がカップリングしていることを示唆している。

第一三共株式会社の研究グループは、ヒト巨細胞腫に特異的に発現する遺伝子の解析から Siglec-15 分子を同定し、マウス・ラット・サル・ヒトなどの Siglec-15 のシグナルを遮断する抗 Siglec-15 中和抗体を作製した^{24,25)}。本研究においては、Siglec-15

の作用を中和する抗 Siglec-15 抗体の効果について、マウス由来の細胞培養系において検討した。

実験材料および方法

(1) マウス骨髄細胞を用いた破骨細胞分化誘導系

ddY マウス (6–10 週齢オス) の脛骨から骨髄細胞を採取した。骨髄細胞 (約 3×10^5 細胞) を細胞培養ディッシュ (48well プレート) に播種し、 $250 \mu\text{l/well}$ で培養開始する。骨髄細胞を M-CSF (100ng/ml) (ロイコプロール, 協和発酵キリン) の存在下で 3 日間培養した後、M-CSF (100ng/ml) とヒト可溶性リコンビナント RANKL (GST fusion protein)(100 ng/ml) (オリエンタル酵母工業) を添加し、さらに 3 日間培養すると多数の多核を呈する破骨細胞が形成される。この後期 3 日間の破骨細胞の分化過程に、抗 Siglec-15 抗体を添加し、破骨細胞分化に対する効果を検討した (図 1)。一方、約 2 週間にわたる長期培養においては、骨髄細胞を M-CSF と RANKL および抗 Siglec-15 抗体の存在下で 3 日おきに培養液を交換した。上記のいずれの培養系において、抗 Siglec-15 抗体のコントロールとして、ラット IgG を同じ濃度で添加した。

培養後、10% 中性ホルマリンとエタノール・アセトン (1:1) にて細胞固定を行い、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色を行った。TRAP 染色液は、基質として Naphthol AS-MX phosphate (SIGMA)、色素を Fast Red Violet LB salt

(SIGMA) を使用し、酒石酸を含む酸性緩衝液を用いた。赤く染色される TRAP 陽性細胞のうち、3 核以上の多核細胞を破骨細胞として計測した。また、ALP 染色を TRAP 染色の後に二重に行い、紫色に染色される細胞群を ALP 陽性細胞とした。ALP 染色液は、基質として Naphthol AS-MX phosphate、色素を Fast Blue BB salt

(SIGMA) を使用し、中性緩衝液を用いた。

抗ラット Siglec-15 モノクローナル中和抗体およびヒトリコンビナント OPG は、第一三共株式会社より供与された。FBS (ウシ胎仔血清) (SAFC Biosciences) を 10%

含む α -MEM (α -minimal essential medium) 培地) (Sigma) を用いた細胞培養系を用いた。

マウスを用いた本実験は、松本歯科大学動物実験委員会の承認の上、動物実験取扱規定に従って行った。

(2) 破骨細胞前駆細胞の同定

新生児マウス (約 3 日齢) の頭蓋骨を採取し、コラゲナーゼとディスパーゼ処理を行い骨芽細胞を調製し、継代を 1 回行い増殖させた骨芽細胞をマイナス 80 度にストックしたものを共存培養に供した。前述の方法により採取した骨髓細胞を骨芽細胞と共存培養を 5 日間行うことにより、破骨細胞前駆細胞の出現を観察した。破骨細胞前駆細胞の形質として、RANKL の受容体である RANK と M-CSF の受容体である c-Fms の発現について、それぞれの抗体を用いた免疫染色を行い、蛍光顕微鏡により観察した²⁶⁾。

(3) 破骨細胞の骨吸収機能の解析

骨芽細胞と骨髓細胞の共存培養を活性型ビタミン D (SIGMA) とプロスタグランジン E₂ (SIGMA) の存在下で、コラーゲンゲル (新田ゼラチン) をコーティングした培養ディッシュ上で行った。3 日毎に培養液交換を行い、培養約 8 日目にコラゲナーゼ処理を行い、コラーゲンゲル上の破骨細胞を含む全細胞を回収した。成熟破骨細胞を含む細胞を象牙切片上に播種し、抗 Siglec-15 抗体の有無にて培養した。培養 2 時間後、破骨細胞の骨吸収活性のマーカであるアクチンリングの形成をローダミン・ファロイジン (Molecular Probe) 染色にて観察した。さらに、培養 24 時間後に象牙質切片上の細胞を綿棒で取り除いた後、ヘマトキシリン液を用いて象牙切片上のそれぞれの吸収窩を紫色に染色した。

(4) Western Blotting 法によるスクレロシンタンパク質の発現解析

象牙質切片上で骨髄細胞を M-CSF と RANKL の存在下で 3 日間培養し、破骨細胞が誘導された状態で、抗 Siglec-15 抗体または OPG の存在下または非存在下でさらに 2 日間培養し、その培養上清を採取した。破骨細胞の培養上清のコントロールとして、骨髄細胞を培養した培養上清を採取し、以後の実験に供した。既にディッシュ上で培養していたラット骨肉腫由来の骨芽細胞株である UMR106 細胞の培養液を半分除去し、既に採取した破骨細胞または骨髄細胞の培養上清を添加した。2 日間の培養後、UMR106 細胞からタンパク質を抽出し、スクレロスチン抗体を用いた Western Blotting を行った¹³⁾。

(5) Real-time RT-PCR 法によるカテプシン K、RANK および LIF の mRNA の発現解析

成熟破骨細胞におけるカテプシン K、RANK および LIF mRNA の発現を解析するため、コラーゲンゲル上の共存培養系で誘導した細胞画分をディッシュに播種した後、抗 Siglec-15 抗体の存在下または非存在下で 2 時間培養した後、Real-time RT-PCR 法を用いて検討した¹³⁾。

結果

抗 Siglec-15 抗体 (200ng/ml) は、マウス骨髄細胞培養系に RANKL と M-CSF を添加し 3 日間で多核破骨細胞が誘導される条件で、TRAP 陽性の 2 核以上の多核破骨細胞の分化をほぼ完全に阻害した (図 1)。この時、TRAP 陽性の単核破骨細胞は多数残存していた。ラット IgG をコントロールとして添加した群では、多数の TRAP 陽性多核および単核破骨細胞が認められた。

骨髄細胞を長期 (約 2 週間) にわたり培養する系において、抗 Siglec-15 抗体は、TRAP 陽性の多核破骨細胞の分化を阻害すると共に、M-CSF と RANKL の存在下で ALP 陽性の骨芽細胞を多数誘導した (図 2)。抗 Siglec-15 抗体の単独添加は、ALP 陽性の骨芽細胞の誘導は認めなかった (図 3)。抗 Siglec-15 抗体の代わりに OPG を添加しても、ALP 陽性の骨芽細胞の誘導は認めなかった (図 3)。この結果から、OPG は多核および単核の破骨細胞形成を阻害するが、ALP 陽性の骨芽細胞を誘導する作用を有さないことが明らかとなった。また、長期骨髄細胞培養系においても、抗 Siglec-15 抗体は多核破骨細胞形成を完全に抑制するが、単核 TRAP 陽性破骨細胞は多数残存していた (図 2)。

骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系 (5 日間) において、RANK 陽性および c-Fms 陽性の破骨細胞前駆細胞 (qOP) が出現する (図 4)。抗 Siglec-15 抗体は qOP の形成に対しては、抑制効果を示さなかった (図 4)。

多核を呈する成熟破骨細胞の機能に対する抗 Siglec-15 抗体の効果を解析した。抗 Siglec-15 抗体の 2 時間処理は、破骨細胞の象牙切片上におけるアクチンリング形成を有意に阻害した (図 5)。また、抗 Siglec-15 抗体の 48 時間処理により象牙質切片上の吸収窩形成も強く阻害された (図 6)。

骨細胞が産生するサイトカインであるあるスクレロスチンは、骨形成を阻害する作用を有し、骨形成を制御する因子として重要な役割を果たしていることが明らかとさ

れてきた。また、破骨細胞の培養上清はラット骨肉腫由来細胞である UMR106 細胞が発現するスクレロスチンの発現を阻害することが報告されている。そこで、破骨細胞に対する Siglec-15 抗体を処理し、その培養上清の UMR106 細胞におけるスクレロスチン発現に対する効果を解析した。その結果、破骨細胞に抗 Siglec-15 抗体の処理の有無に拘らず、それらの培養上清は、UMR106 細胞におけるスクレロスチン発現を阻害した (図 7)。ポジティブコントロールとして用いたプロスタグランジン E₂

(PGE₂) はスクレロスチン発現を阻害した (図 7)。一方、破骨細胞の培養上清とは異なり、骨髓細胞の培養上清は、スクレロスチンの発現に影響を与えなかった。抗 Siglec-15 抗体の UMR106 細胞に対する直接処理は、スクレロスチン発現に影響を与えなかった (図 7)。

前述の実験系における破骨細胞由来のスクレロスチン発現抑制因子は、Leukemia inhibitory factor (LIF : 白血病阻害因子) であることが明らかとされている¹³⁾。そこで、破骨細胞の特異形質発現に対する抗 Siglec-15 抗体の効果について検討した。その結果、抗 Siglec-15 抗体を処理しても、カテプシン K および RANK の発現維持と同様に、LIF 発現も維持されていた (図 8)。

考察

骨組織においては、破骨細胞による骨の吸収と骨芽細胞による骨の形成が絶え間なく繰り返されている。この骨吸収と骨形成のカップリングにより、力学的なストレスに耐えられ弾力性を有する新しい骨組織が形成される。近年、分子レベルで骨吸収と骨形成に関する研究が進み、さまざまなホルモン、サイトカイン、転写因子の作用機構の詳細が明らかにされ、骨カップリング制御機構を説明するための重要な実験結果が蓄積してきた。古典的な骨代謝共役制御機構は、破骨細胞が骨基質中の TGF- β を掘り出し、骨芽細胞を活性化するというものである²⁷⁾。一方、破骨細胞自身が発現・産生する各種分子である S1P, ephrin B2, ephrin A2, Sema 4D, PDGF-BB, Wnt10b, Cthrc1, C3a, カテプシン K などの骨カップリング機構における作用機序が報告された。破骨細胞由来の LIF は、骨細胞におけるスクレロスチンの発現を低下させ、骨形成を促進する可能性が示されている^{13,28)}。さらに、骨リモデリング機構を説明する画期的な新しい説（破骨細胞から骨芽細胞活性化へのリバースシグナル）も登場してきた²⁷⁾。

免疫系細胞においてカルシウムシグナルを惹起する ITAM と呼ばれる配列が発見された。ITAM は、T 細胞や B 細胞の受容体と会合する細胞膜アダプター分子の細胞内ドメインに共通してみられるモチーフである。ITAM 配列を有する DAP12 と FcR γ は、破骨細胞において発現が高い。

DAP12 と会合する免疫グロブリンスーパーファミリー分子である Siglec-15 は、破骨細胞の分化に伴って発現が誘導される。Siglec-15 は、細胞内に存在する DAP12 アダプタータンパク質と会合し、ITAM を介してシグナルを伝達する。このシグナルは RANKL シグナルと合流し、共刺激シグナルとして破骨細胞の形成を誘導する。

Siglec-15 遺伝子欠損マウスは、骨吸収能が低下することにより、骨量が増加するが、大理石骨病を呈するまでの骨量増加は認めない^{22,23)}。Siglec-15 遺伝子欠損マウスの骨

組織においては、多核の破骨細胞数は正常マウスと比較して減少しているが完全な欠如ではない。今回の抗 Siglec-15 抗体の細胞培養系への添加は、多核破骨細胞形成を完全に阻害するが、単核の TRAP 陽性破骨細胞は多数残存する。この *in vivo* と *in vitro* の実験結果の差異については、細胞培養系における特殊性（中和抗体の活性など）と考えられる。破骨細胞の融合に対する Siglec-15 抗体の作用については今回解析しておらず、今後の課題である。

ITAM モチーフを有する様々な免疫受容体アダプタータンパク質のうち、破骨細胞においては、DAP12 と FcRγ の発現が高いことが明らかとなり、Siglec-15 は DAP12 と結合する。DAP12 と FcRγ のダブル欠損マウスは大理石骨病を呈するが、歯牙萌出には異常は認められず生存する^{18,19}。FcRγ 単独の遺伝子欠損マウスの骨は正常な表現型を示す。DAP12 単独の遺伝子欠損マウスでは、軽度な大理石骨病を呈する。このことから、Siglec-15 シグナル単独では、破骨細胞分化や骨吸収機能の共刺激シグナルとして完全な機能を果たすことができないことが考えられる。

今回の実験結果から、抗 Siglec-15 抗体は、マウス由来のマクロファージ系細胞から破骨細胞への分化誘導と成熟破骨細胞による骨吸収機能を強く阻害することが明らかとなった。さらに、抗 Siglec-15 抗体は、M-CSF と RANKL の存在下で、TRAP 陽性の多核破骨細胞の分化を阻害すると共に、ALP 陽性の骨芽細胞を多数誘導した。この時、多核破骨細胞形成は完全に抑制されたが、単核 TRAP 陽性前破骨細胞の存在が認められた。つまり、抗 Siglec-15 抗体は、破骨細胞前駆細胞から多核破骨細胞への分化と骨吸収機能を阻害すると共に、骨芽細胞の分化を促進する可能性が考えられる。抗 Siglec-15 抗体で処理した破骨細胞においてカテプシン K および RANK の発現維持と同様に、LIF 発現も維持されていた。この結果から、抗 Siglec-15 抗体で処理した破骨細胞による骨形成の促進作用に、LIF 発現の維持が関与する可能性が示された。

抗 Siglec-15 抗体を正常マウスに投与することにより、骨密度を上昇させる実験結果が報告されている²⁹⁾。また、卵巣摘出ラットとカニクイサルを用いた前臨床薬効薬理試験において、骨密度、骨質、骨強度の改善効果が確認されている^{24,25)}。更に、抗 Siglec-15 抗体の薬効の特徴として、骨吸収の抑制と骨形成の維持というカテプシン K 阻害剤に類似した理想的な薬効プロファイルも前臨床試験と Ph1 試験で確認された³⁰⁾。

前述のように、抗 Siglec-15 抗体は、破骨細胞の分化抑制に対して、単核破骨細胞が残存するという完全な阻害効果は示さない。また、破骨細胞による骨吸収活性（吸収窩形成）に対しても、抗 Siglec-15 抗体は、ビスホスホネートとは違い、完全阻害を示さない。抗 Siglec-15 抗体を投与した動物実験においても、骨吸収阻害作用について同様の結果である。このマイルドな骨吸収阻害作用こそ、骨粗鬆症治療薬としての優位な効果につながると考えている。

既存の骨粗鬆症治療薬であるビスホスホネートや抗 RANKL 中和抗体は、破骨細胞の分化と骨吸収機能を完全に阻害することにより、骨代謝カップリング（骨形成）も阻害してしまう。しかし、抗 Siglec-15 抗体は、骨形成に対して抑制作用を示さず、骨芽細胞の分化を促進する可能性が示された。今後、抗 Siglec-15 抗体を骨粗鬆症治療薬として臨床応用する際、その投与方法の選択、そして、薬剤誘発性顎骨骨髄炎の発症や抗体薬使用の副作用などを含めた各種副作用の詳細な解析が必要であることは言うまでもない。抗 Siglec-15 抗体を用いた新しい骨粗鬆症治療薬の開発を期待したい。

結論

抗 Siglec-15 抗体は、マウスの骨髄細胞培養系において、破骨細胞前駆細胞から多核破骨細胞への最終分化と骨吸収機能を阻害すると共に、骨芽細胞の分化を促進する可能性が考えられる。

謝辞

稿を終わるにあたり、御懇篤なるご指導と御校閲を賜りました松本歯科大学大学院
宇田川教授に深く感謝致します。

本研究の遂行および論文作成にあたり、ご助言・ご協力を頂きました松本歯科大学
大学院、平岡教授、内田教授、十川教授、松本歯科大学総合歯科医学研究所の皆様
には、心から感謝申し上げます。

最後に、この研究生生活を絶えず励ましてくれました両親、祖父母に心から感謝致
します。

文献

- 1) Ott SM (2002) Histomorphometric analysis of bone remodeling. In Principles of bone biology, Second edition, Volume 1. ed by Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. New York, Academic press, p303-319
- 2) Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT and Martin TJ (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20 : 345-57.2)
- 3) Chambers TJ (2000) Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *J Pathol* 192 : 4-13.
- 4) 高橋直之 (2012) 破骨細胞の分化メカニズム. *医学の歩み* 242 : 649-654
- 5) 宇田川信之, 小出雅則, 溝口利英, 中村美どり, 下平滋隆, 田口明 (2016) 骨はダイナミックに躍動している. *日本顎咬合学会誌* 36:161-170
- 6) Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N and Suda T (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand of osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 3597-602.
- 7) Baron R, Neff L, Tran Van P, Nefussi JR and Vignery A (1986) Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts. *Am J Pathol* 122 : 363-78.6
- 8) Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennet L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby

- P, Lee R and Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin : a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89 : 309-19.
- 9) Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N, Yasuda H, Mochizuki S, Gomibuchi T, Yano K, Shima N, Washida N, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Ozawa H (1998) Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* 247 : 610-615.
- 10) Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS (1998) Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 12 : 1260-1268.
- 11) Nakamura M, Udagawa N, Matsuura S, Mogi M, Nakamura H, Horiuchi H, Saito N, Hiraoka BY, Kobayashi Y, Takaoka K, Ozawa H, Miyazawa H, Takahashi N (2003) Osteoprotegerin regulates bone formation through a coupling mechanism with bone resorption. *Endocrinology* 144 : 5441-5449.
- 12) Koide M, Kobayashi Y, Ninomiya T, Nakamura M, Yasuda H, Arai Y, Okahashi N, Yoshinari N, Takahashi N and Udagawa N (2013) Osteoprotegerin-deficient male mice as a model for severe alveolar bone loss: Comparison with RANKL-overexpressing transgenic male mice. *Endocrinology* 154:773-82
- 13) Koide M, Kobayashi Y, Yamashita T, Uehara S, Nakamura M, Hiraoka BY, Ozaki Y, Iimura T, Yasuda H, Takahashi N and Udagawa N (2017) Bone Formation is coupled to resorption via suppression of sclerostin expression by osteoclasts. *J Bone Mineral Res* 32: 2074-86.

- 14) Ishida N, Hayashi K, Hoshijima M, Ogawa T, Koga S, Miyatake Y, Kumegawa M, Kimura T, Takeya T. (2002) Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis in vitro and elucidation of NFAT2 as a key regulator. *J Biol Chem* 277 : 41147-56.
- 15) Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T and Taniguchi T (2002) Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 3 : 889-901.
- 16) Asagiri M, Sato K, Usami T, Ochi S, Nishina H, Yoshida H, Morita I, Wagner EF, Mak TW, Serfling E, Takayanagi H. (2005) Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *J Exp Med* 202 : 1261-1269.
- 17) Aliprantis AO, Ueki Y, Sulyanto R, Park A, Sigrist KS, Sharma SM, Ostrowski MC, Olsen BR, Glimcher LH. (2008) NFATc1 in mice represses osteoprotegerin during osteoclastogenesis and dissociates systemic osteopenia from inflammation in cherubism. *J Clin Invest* 118 : 3775-3789.
- 18) Koga T, Inui M, Inoue K, Kim S, Suematsu A, Kobayashi E, Iwata T, Ohnishi H, Matozaki T, Kodama T, Taniguchi T, Takayanagi H, Takai T. (2004) Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature* 428 : 758-763.
- 19) Kaifu T, Nakahara J, Inui M, Mishima K, Momiyama T, Kaji M, Sugahara A, Koito H, Ujike-Asai A, Nakamura A, Kanazawa K, Tan-Takeuchi K, Iwasaki K, Yokoyama W, Kudo A, Fujiwara M, Asou H and Takai T. (2003) Osteopetrosis

- and thalamic hypomyelinoses with synaptic degeneration in DAP12-deficient mice. *J Clin. Invest.* 111, 323-332.
- 20) Hiruma Y, Hirai T, Tsuda E. (2011) Siglec-15, a member of the sialic acid-binding lectin, is a novel regulator for osteoclast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 409 : 424-429.
 - 21) Ishida-Kitagawa N, Tanaka K, Bao X, Kimura T, Miura T, Kitaoka Y, Hayashi K, Sato M, Maruoka M, Ogawa T, Miyoshi J, Takeya T. (2012) Siglec-15 protein regulates formation of functional osteoclasts in concert with DNAX-activating protein of 12 kDa (DAP12). *J Biol Chem* 287 : 17493-17502.
 - 22) Kameda Y, Takahata M, Komatsu M, Mikuni S, Hatakeyama S, Shimizu T, Angata T, Kinjo M, Minami A, Iwasaki N. (2013) Siglec-15 regulates osteoclast differentiation by modulating RANKL-induced phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Erk pathways in association with signaling adaptor DAP12. *J Bone Miner Res* 28 : 2463-2475.
 - 23) Hiruma Y, Tsuda E, Maeda N, Okada A, Kabasawa N, Miyamoto M, Hattori H, Fukuda C. (2013) Impaired osteoclast differentiation and function and mild osteopetrosis development in Siglec-15-deficient mice. *Bone* 53 : 87-93.
 - 24) Fukuda C, Okada A, Karibe T, Hinuma Y, Kumakura S, Tsuda E. (2017) A novel bone formation-sparing anti-resorptive agent, DS-1501a, increased BMD and bone biomechanical properties of cortical bone in ovariectomized cynomolgus monkeys. *J Bone Miner Res* 32 (Suppl 1) : 112.
 - 25) Fukuda C, Tsuda E, Okada A, Amizuka N, Hasegawa T, Karibe T, Hinuma Y, Takagi N, Kumakura S. (2017) Anti-Siglec-15 antibody reduced bone resorption

- while maintaining bone formation in ovariectomized (OVX) rats and monkeys.
J Bone Miner Res 32 (Suppl 1) : 112.
- 26) Mizoguchi T, Muto A, Udagawa N, Arai A, Yamashita T, Hosoya A, Ninomiya T, Nakamura H, Yamamoto Y, Kinugawa S, Nakamura M, Nakamichi Y, Kobayashi Y, Nagasawa S, Oda K, Tanaka H, Tagaya M, Penninger JM, Ito M, Takahashi N. (2009) Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. J Cell Biol 184 : 541-54.
- 27) 中村美どり, 中道裕子, 小出雅則, 宇田川信之 (2016) オステオプロテゲリンによる骨リモデリング制御. THE BONE 30 : 175-180.
- 28) 小出雅則, 宇田川信之 (2016) スクレロスチンによる骨リモデリング制御. THE BONE 30 : 169-173.
- 29) Stuiblé M, Moraitis A, Fortin A, Saragosa S, Kalbakji A, Filion M, Tremblay GB. (2014) Mechanism and function of monoclonal antibodies targeting siglec-15 for therapeutic inhibition of osteoclastic bone resorption. J Biol Chem 289 : 6498-6512.
- 30) Dishy V, Kang D, Warren V, Maxwell W, Levinson B, Kochan J, He L, Baz-Hecht M, Fukuda C, Koga J, Tsuda E, Watanabe K. (2017) A phase 1, subject and investigator blinded, sponsor unblinded, placebocontrolled, randomized, 2 part, sequential, single ascending dose study to assess the safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of DS-1501a in healthy young subjects and healthy postmenopausal woman. J Bone Miner Res 32 (Suppl 1) : 107-108.

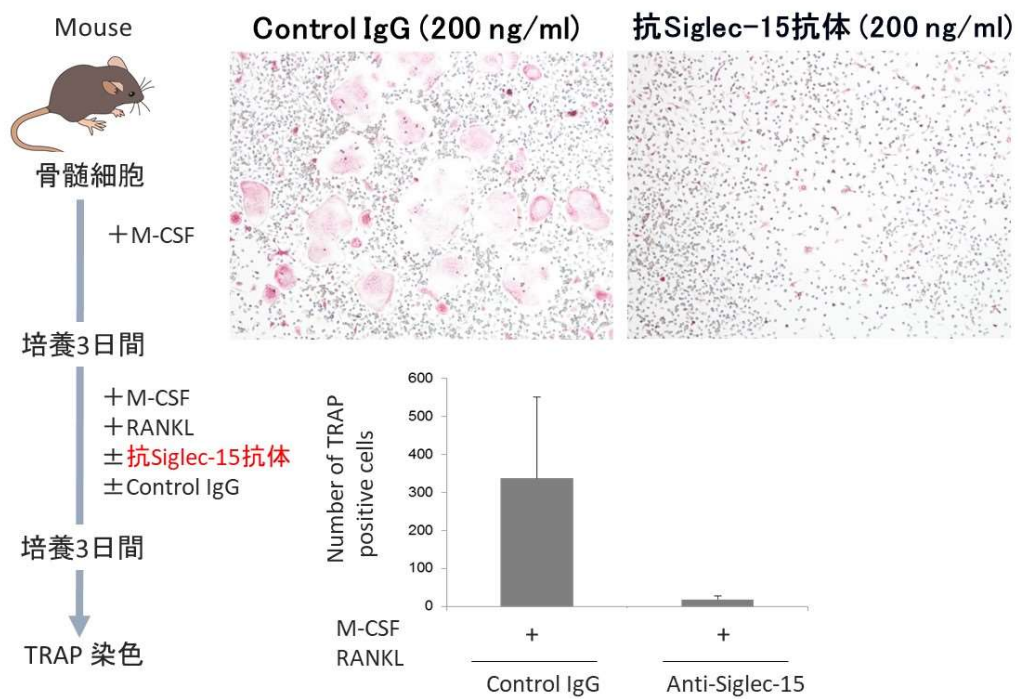
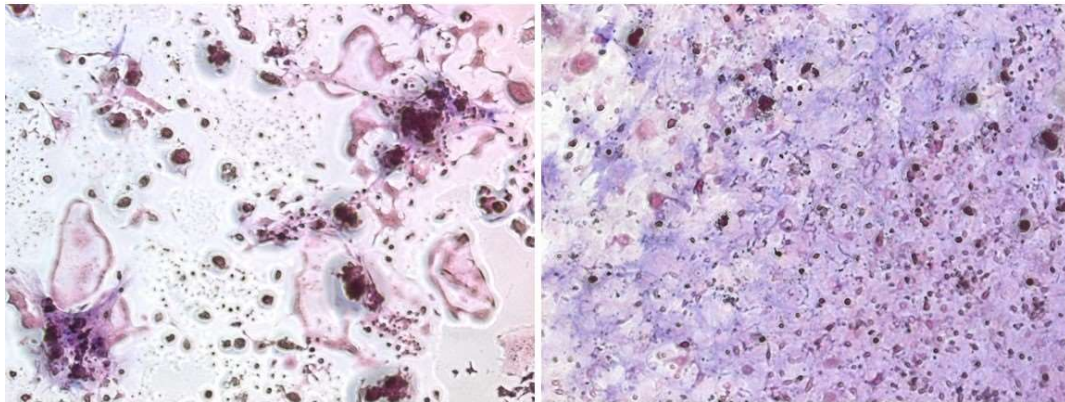


図1 破骨細胞の分化に対する抗 Siglec-15 抗体の効果（培養 6 日目）

TRAP およびALP二重染色



Control IgG (200 ng/ml)

抗Siglec-15抗体 (200 ng/ml)

図2 破骨細胞と骨芽細胞の分化に対する抗 Siglec-15 抗体の効果 (培養 14 日目)

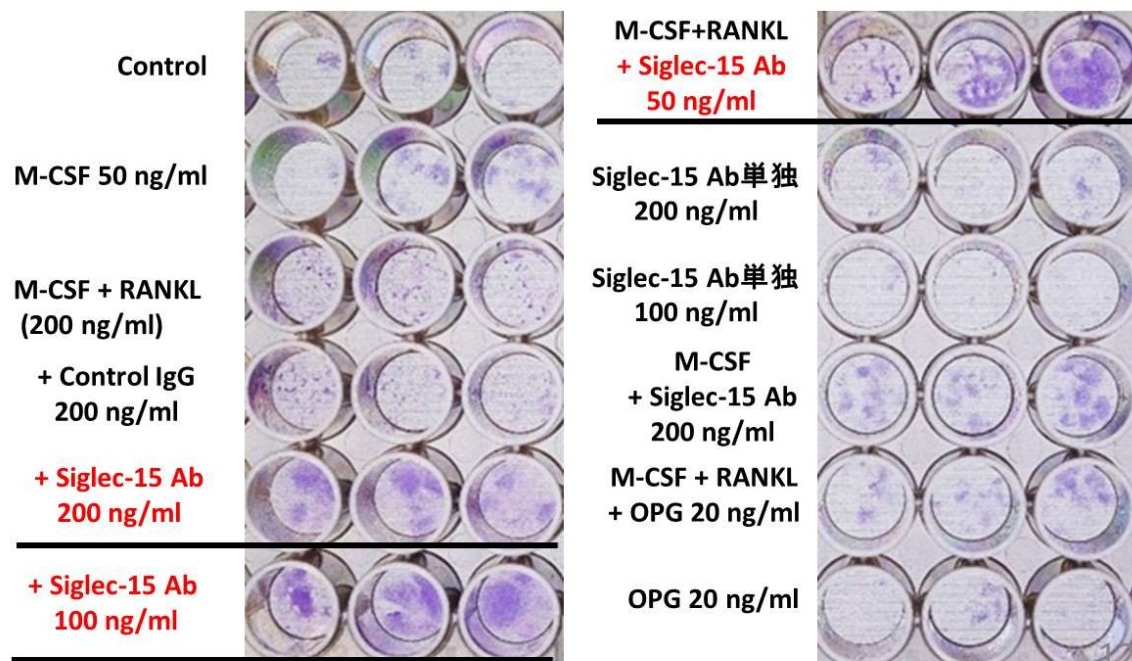


図3 骨芽細胞の分化に対する抗 Siglec-15 抗体および OPG の効果（培養 14 日目）

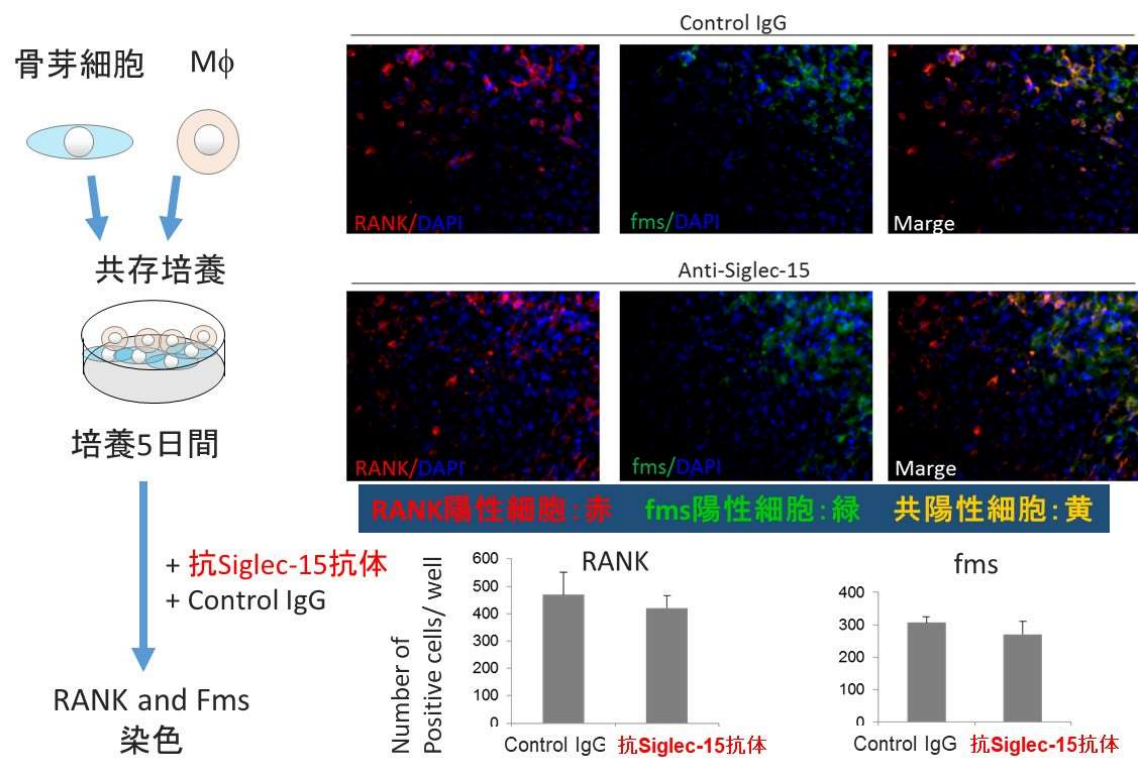


図4 破骨細胞前駆細胞に対する抗 Siglec-15 抗体の効果（培養 5 日目）

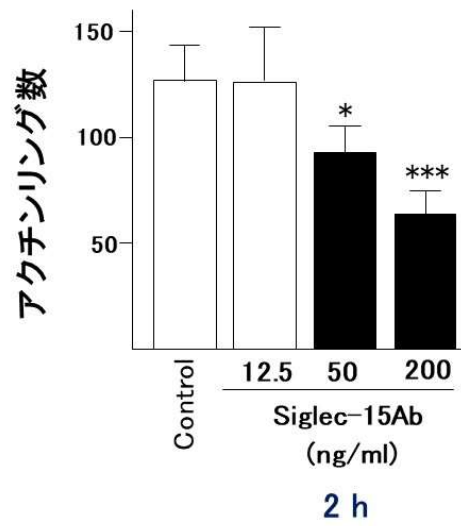
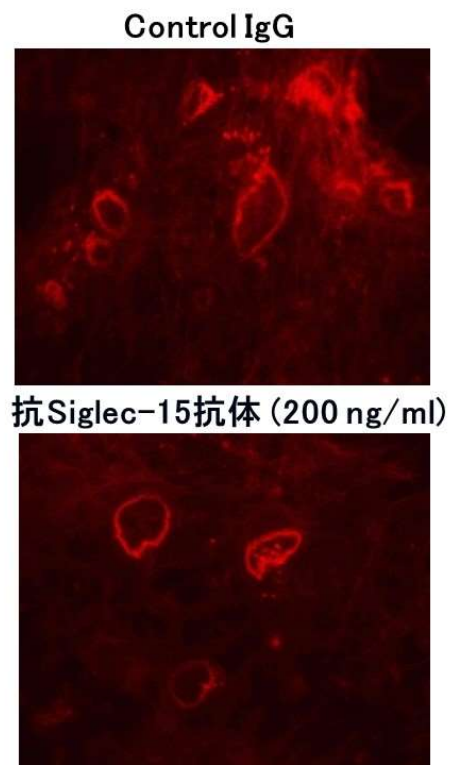


図5 破骨細胞のアクチンリング形成に対する抗 Siglec-15 抗体の効果（培養 2 時間目）

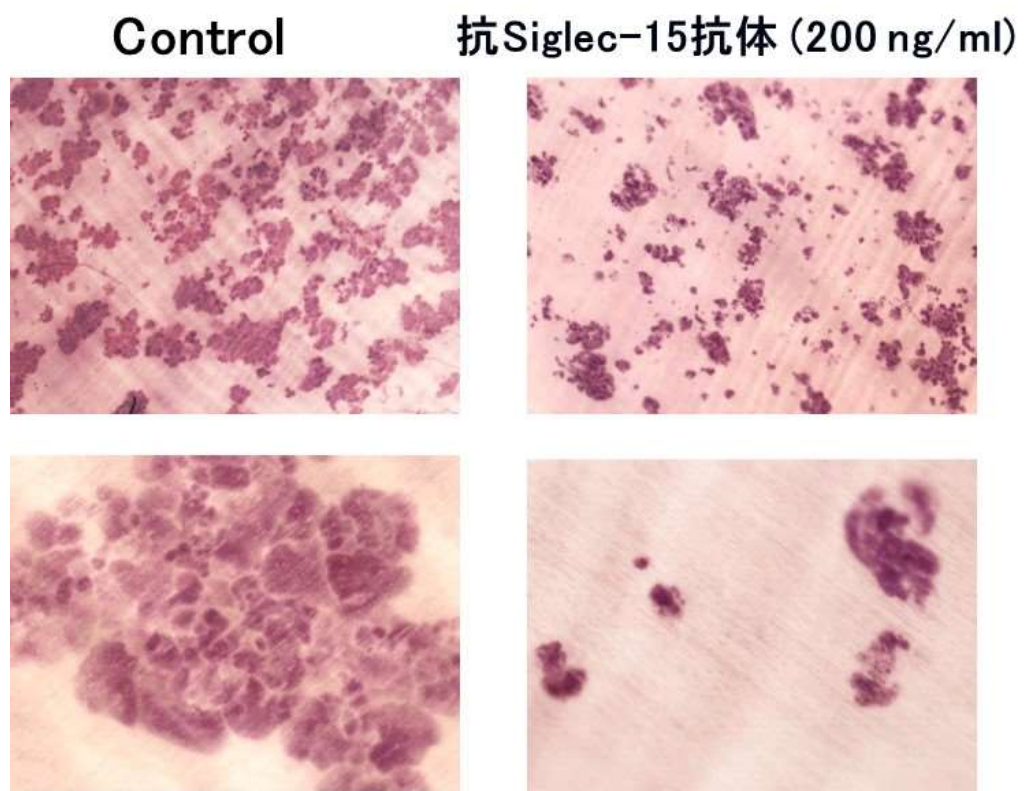


図 6 破骨細胞の硬組織吸収に対する抗 Siglec-15 抗体の効果（培養 2 日目）

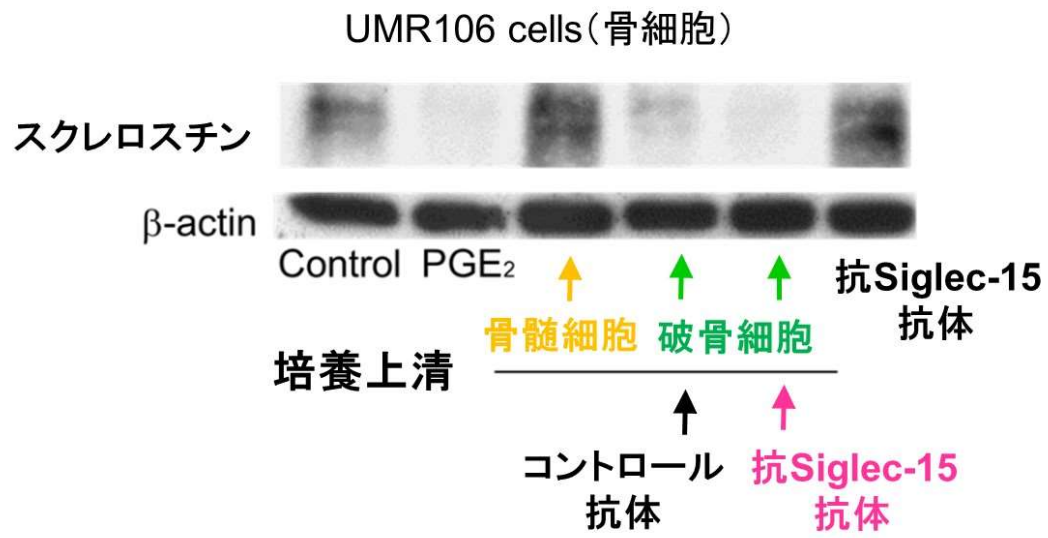


図 7 UMR106 細胞におけるスクレロスチン発現に対する抗 Siglec-15 抗体の効果

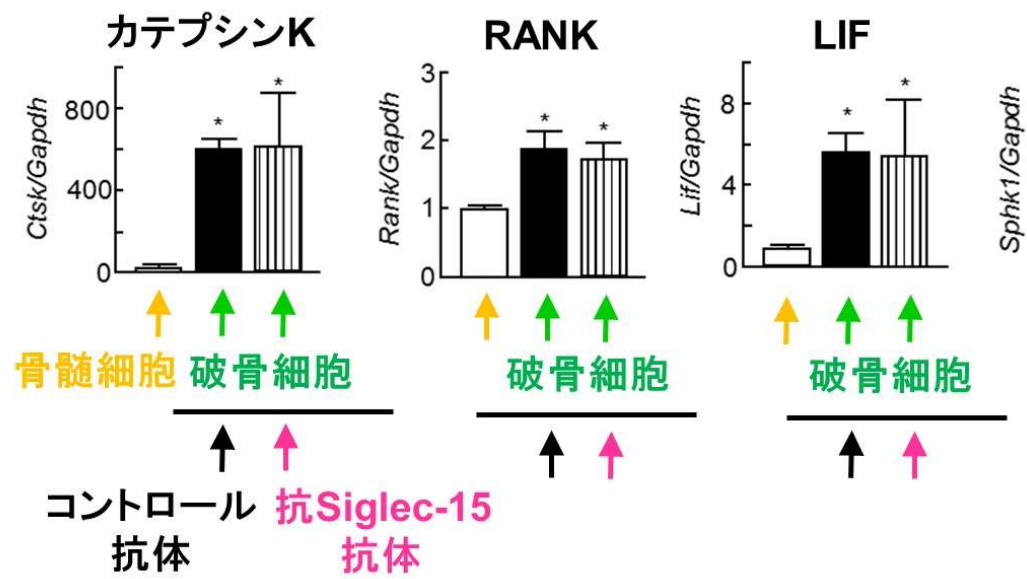


図8 破骨細胞におけるカテプシン K、RANK、LIF 発現に対する抗 Siglec-15 抗体の効果

図の説明

- 図 1 破骨細胞の分化に対する抗 Siglec-15 抗体の効果（培養 6 日目）
- 図 2 破骨細胞と骨芽細胞の分化に対する抗 Siglec-15 抗体の効果（培養 21 日目）
- 図 3 骨芽細胞の分化に対する抗 Siglec-15 抗体および OPG の効果（培養 21 日目）
- 図 4 破骨細胞前駆細胞に対する抗 Siglec-15 抗体の効果（培養 5 日目）
- 図 5 破骨細胞のアクチンリング形成に対する抗 Siglec-15 抗体の効果（培養 2 時間目）
- 図 6 破骨細胞の硬組織吸収に対する抗 Siglec-15 抗体の効果（培養 2 日目）
- 図 7 UMR106 細胞におけるスクレロスチン発現に対する抗 Siglec-15 抗体の効果
- 図 8 破骨細胞におけるカテプシン K、RANK、LIF 発現に対する抗 Siglec-15 抗体の効果
果